

525 877
10/525877

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際公開

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018656 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/00, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010766

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-245987 2002 年 8 月 26 日 (26.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人物質・材料研究機構 (NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 田中 順三

(TANAKA, Junzo) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 生駒 俊之 (IKOMA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 宗田 大 (MUNETTA, Takeshi) [JP/JP]; 〒191-0012 東京都日野市日野937-22 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

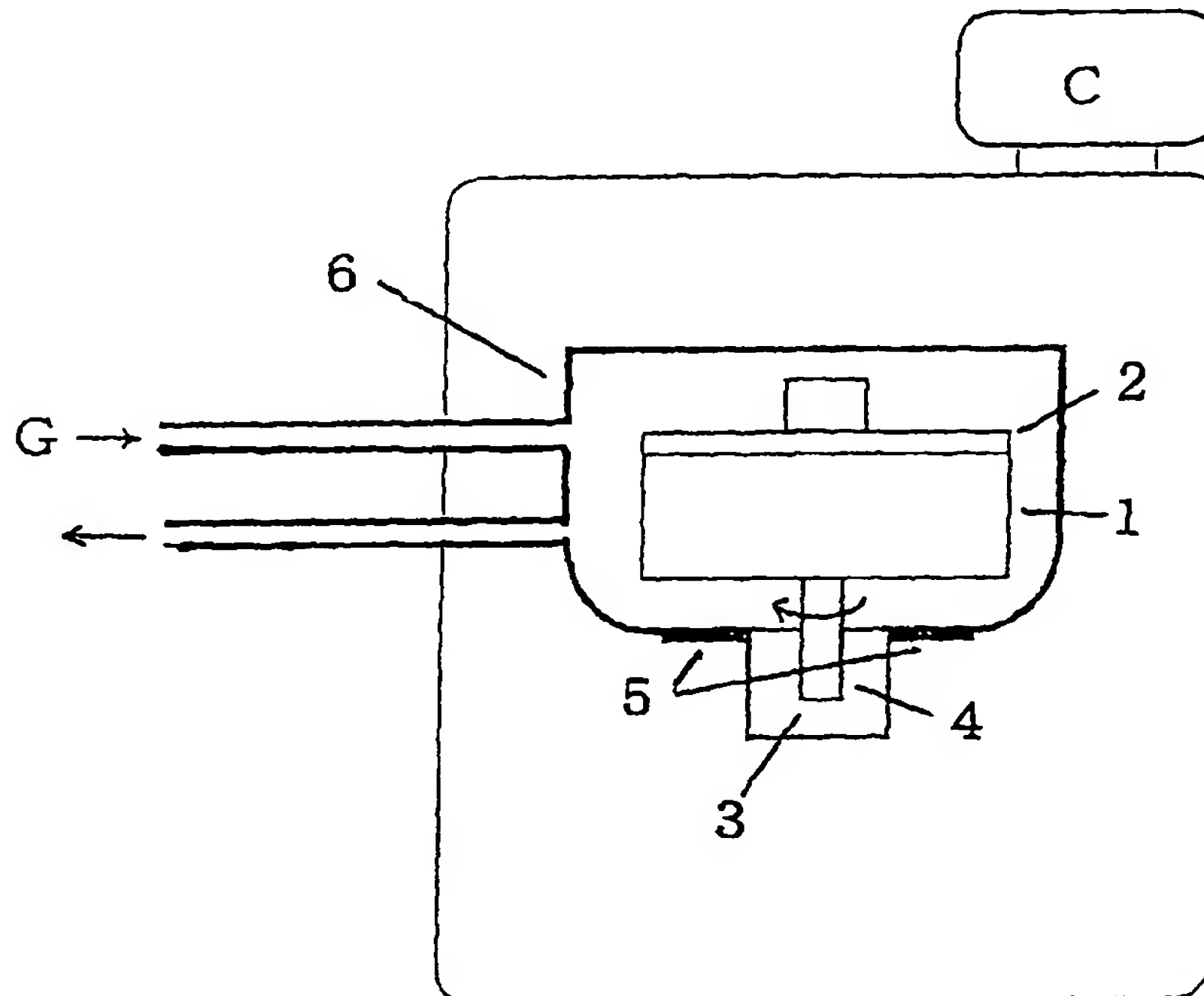
(81) 指定国 (国内): CA, US.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL CULTURE METHOD AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: 細胞培養方法とその装置



(57) Abstract: By rotating a cell culture apparatus while controlling the temperature and the atmospheric gas, cells are cultured under the application of hydrostatic pressure due to centrifugal force. According to this method, cells are efficiently activated and cultured while inhibiting dedifferentiation.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/018656 A1



(57) 要約: 温度と雰囲気ガスが制御された条件下で細胞培養器を回転することによって遠心力による静水圧を付加して培養するもので、細胞を培養するに際し、細胞を活性化し、脱分化を抑えて、効率的な培養を行なうものとする。

明 細 書

細胞培養方法とその装置

技術分野

この出願の発明は細胞の培養方法とその装置に関するものである。さらに詳しくは、再生医学に有用な特定の細胞等を簡便に効率的に得ることができる新しい細胞培養方法とその装置に関するものである。

背景技術

従来より、細胞の培養においては、培地の表面層にだけ伸展する単層細胞培養では所定の細胞が途中脱分化し機能を失ってしまうため、これを防ぐために成長因子・薬剤などを添加して脱分化を制御する方法や、機械的刺激により細胞機能を活性化する方法がとられている。

このうちの機械的刺激によって細胞脱分化を制御する方法としては静水圧を用いる方法 (Effects of physical stimulation on chondrogenesis in vitro, Materials Science and Engineering C6 (1998) 301-306) と遠心力を利用する高密度培養技術が知られている。

しかしながら、従来の静水圧を利用する方法は、コストが高いだけでなく培養装置が大型で広いスペースを必要とするという欠点があり、一方、従来の遠心力の利用による方法は、あらかじめインキュベーターでの培養の後に、常温で遠心力を加えることから、培養環境としては継続的に長時間刺激を加えることや、周期的に刺激を変化させることはできないという問題があった。しかも従来の遠心力の利用法では、温度や雰囲気等を制御することもできなかった。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの従来の問題点を解消し、機械的刺激によって脱分化を抑制して簡便に効率的な細胞培養を可能とする新しい方法とそのための装置を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するためのものとして、第1には、細胞を培養する環境下で継続的に、遠心力による静水圧の付加で力学環境を調節し、細胞に刺激を与えることを特徴とする細胞培養方法を提供する。また、第2には、静水圧の付加による力学的培養環境の調節では、遠心力によって細胞に対する静水圧の付加を周期的に変化させるか、もしくは一定期間持続することを特徴とする上記細胞培養方法を提供し、第3には、静水圧の付加が60 MPa以下の範囲で行われることを特徴とする上記細胞培養方法を、第4には、静水圧の付加が0.5秒～6週間の範囲で行われることを特徴とする上記細胞培養方法を、第5には、静水圧の付加が遠心機の回転数の調節により行なわれることを特徴とする上記細胞培養方法を、第6には、温度と雰囲気気を調節することを特徴とする上記細胞培養方法を提供する。そして、この出願の発明は、第7には、各種生体材料とともに細胞を培養することを特徴とする上記細胞培養方法を提供する。

さらにこの出願の発明は、第8には、密閉容器内に回転軸で支持されて遠心回転によって細胞に静水圧が付加される細胞培養器を備えていることを特徴とする細胞培養装置を提供し、第9には、細胞培養器の回転時間と回転速度を制御する制御機構を備えていることを特徴とする上記細胞培養装置を、第10には、60 MPa以下の静水圧を付加するために回転数が10～25000 rpmの範囲で制御可能とされていることを特徴とする上記細胞培養装置を、第11には、細胞培養器内部が同時に複数種類の細胞培養ができるように区分されていることを特徴とする上記細胞培養装置を提供する。

第12には、この出願の発明は、密閉容器内への雰囲気ガスの注入口とその排気口、並びに雰囲気ガスの注入、排気の制御機構が備えられていることを特徴とする上記の細胞培養装置を提供し、第13には、密閉容器内の温度の制御機構が備えられていることを特徴とする上記細胞

培養装置を提供する。

生物の成長には未分化で機能が特定されていない幹細胞が分化を繰り返しながら順次その機能が特定されて、種々の器官や組織になっていくのであるが、この生物の体内で行なわれている細胞分化は常に同じ条件下で行なわれているわけではなく生体内での圧力や温度等の環境は変化している。

この出願の発明は、この点に着眼したものであり、細胞培養を実際の生体内の環境に近い条件下で行なおうとするものである。この生体内に類似した環境を創出しようとするこの出願の発明では、前記のとおり、細胞の培養を、遠心力による静水圧の付加で培養環境を調節して行なうことを特徴としている。

このような特徴は、遠心力によって回転駆動される試料管内部の液体には絶えず遠心力と静水圧がかかっており、しかも、遠心力と静水圧の大きさは遠心機の回転数を調整することにより簡単に制御することができること、そしてこのことを細胞の培養時に実現することで、細胞に刺激を与えて活性化し、細胞脱分化を抑制することができるとの知見に基づいている。

そして、この出願の発明は、培養の温度、雰囲気の制御も実現する。この出願の発明では、このようにして細胞の活性化・脱分化を制御しながら増殖をするとともに、細胞間に張り巡らされて細胞の生存を維持し、増殖・分化を制御する様々な情報が書き込まれているとされる細胞外マトリックスを含む各種生体材料も短時間に入手することを可能とする。再生医学への応用が有望である。

たとえば、この発明の細胞培養装置を回転させて細胞に $0.1 \text{ MPa} \sim 30 \text{ MPa}$ の静水圧を周期的に与えることによって人間の歩行のリズムと同等の生体内環境を創出することができるばかりでなく、高い重力（たとえば深海での環境）も制御できものであり、そして周期的に変化する静水圧と遠心力を細胞に作用させることによって細胞の活性を

高めて、遠心力により細胞凝集体が形成され、また静水圧により細胞の代謝を調節して脱分化を制御することができるものである。

以上のような特徴は、従来の静水圧の利用法や、あらかじめ培養を行なった後に遠心力を作用させ従来の方法からは全く想定することができず、実現もされなかったものである。

図面の簡単な説明

図1は、この出願の発明の細胞培養装置の概要を例示した断面構成図である。

図2は、細胞培養器内の試験容器と付加される力について例示した模式図である。

図3は、同じ静水圧を保った状態を例示した静水圧と時間との相関図である。

図4は、周期的に静水圧を変化させた状態を例示した静水圧と時間との相関図である。

図5は、この出願の遠心力を利用する発明と従来法である高密度培養法および単層培養法の細胞数の増加を示すグラフである。

図6は、この出願の発明の静水圧を付加する方法で1週間培養した細胞の位相差顕微鏡写真である。

図7は、従来の単層培養法で1週間培養した細胞の位相差顕微鏡写真である。

なお、図中の符号は次のものを示す。

- 1 細胞培養器
- 2 細胞培養器の蓋
- 3 回転軸
- 4 モータ
- 5 加熱器
- 6 密閉容器

- 7 培養管
- 8 回転軸と培養液面間の距離
- 9 遠心力
- C 制御機構
- G 炭酸ガス混入水蒸気

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴を有するものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

まず、この出願の発明の細胞培養方法とその装置の概要を図に従って説明すると、図1は細胞培養装置の全体図を示したものであり、蓋(2)の開閉によって細胞および培養液の充填と取り出しが自由にできるようになっている。この細胞培養器(1)は加熱機構(5)を備えた密閉容器(6)内でモータ(3)に連結した回転軸(4)に支持されている。また、この密閉容器(6)は炭酸ガスを混入された水蒸気(G)が循環されている。この雰囲気ガスは、蓋(2)の開閉によって、あるいは蓋(2)に設けた通路を介して細胞培養器(1)内に注入、もしくはそこから排気されるようにしている。そして、細胞培養器(1)の回転速度や回転時間、温度および雰囲気ガスの条件は、あらかじめ設定された制御機構(C)によって制御されている。

図2は、図1の細胞培養器(1)の内部を部分的に例示した模式図であり、回転軸(3)に連結された試験管状の容器(7)を細胞と培養液を入れて回転することによって容器(7)内の細胞に遠心力(9)による静水圧を与えることができるようにしている。

この時の回転速度や回転時間は図1の制御機構(C)で制御される。これによって細胞にかかる静水圧と遠心力の大きさと時間は任意に制御可能とされる。

静水圧の大きさと遠心力については、たとえば次のように表される。

表 1

Hydrostatic pressure 溶液の高さに依存	Centrifugal Force (細胞・材料に掛かる。)
$HP(\text{atmcm}^2/\text{Kg})=5.48 \times 10^{-9} \times D \times Q^2 (r^2 - r_{\text{mem}}^2)$	$RCF(G)=11.18 \times r(\text{cm}) \times (Q/1000)^2$
D : 溶液の平均密度 (g ml ⁻¹)	r : 粒子と中心の距離
r : 中心からの距離 (cm)	Q : 回転速度 (rpm)
r _{mem} : 液体表面からの回転中心までの距離 (cm)	

これによって、回転数と静水圧との関係を例示すると次のようになる。

表 2

細胞培養溶液 (MEM)	:	1.14g/cm ⁻¹		
溶液の高さ	:	2cm		
回転数	:	3000rpm	5000rpm	10,000rpm
静水圧	:	2MPa	5.6Mpa	22.5Mpa

図 3 は回転速度を一定時間保持した時の容器 (7) の静水圧を示したものであり、また、図 4 は回転速度を間歇的に変化させた時の容器 (7) 内の静水圧の変化を図示したものである。この出願の発明は、たとえば、このような図 3 および図 4 に単純化して例示されている容器内の静水圧の付加パターンやそれら付加パターンを組合せながら行なうものであるが、組合せを行なうための条件設定としては下記の認識に基づいている。

すなわち、生体内環境に類似する培養環境下で細胞を培養させる場合の静水圧を形成するための具体的な回転数としては 10 ～ 25000

r p m が好ましく、特に 1 0 ~ 2 3 0 0 0 r p m が好ましいとしているが、これは、回転数が 2 5 0 0 0 r p m を超えると静水圧が 6 0 M P a を超えて細胞が破壊されてしまう可能性があるためである。

また、静水圧の付加時間として 0 . 5 秒 ~ 6 週間の範囲に特定しているのは、人間が激しい運動をした時に受ける時の圧のサイクルは 0 . 5 秒と言われている。また一方、人間の身体に移植する際に使用されている細胞の培養期間は大体 4 週間以内であることに基づくものである。

さらに、温度条件としては現存する生体体温の範囲である 0 ° C ~ 5 0 ° C 程度が好ましいが、一般的な生体の体温範囲である 2 5 ° C ~ 4 0 ° C 程度が特に好ましい。

このような条件下で細胞培養したものと従来の方法で細胞培養したものを比較したのが図 5 である。この図 5 はこの出願の発明で培養したもの（黒丸で表示）と従来の高密度培養（白四角で表示）および単層培養（白丸で表示）したものを 1 週間 ~ 3 週間培養した時の細胞数をプロットしたものである。図 5 から明らかなように 3 週間後にはこの出願の発明のものは従来の高密度培養に比較して 1 5 %、また従来の単層培養に比較して 3 0 % の細胞増殖率となっている。

以下にこの出願の発明と単層培養の実施例を示してさらに詳しく説明する。

もちろん、以下の例によって発明が限定されることはない。

実 施 例

軟骨細胞（ 5×10^4 個 / m l）を M E M（Minimum Essential Medium）培養液により、2 5 ° C の温度、大気中の雰囲気中で 1 週間、遠心培養した。遠心条件は、1 日に 2 回、1 0 0 0 r p m で 3 0 分間回転させる操作を 1 週間に 3 回行なった。一方、コントロールとして単層培養を行なった。

遠心培養を行なった結果、最終的な細胞数は 10.2×10^4 個 / m l であつたのに対し、単層培養では 8.4×10^4 個 / m l であり、単

層培養に比較して、遠心培養の方が少なくとも20%増殖率が向上することを示している。

また、この時の状態を位相差顕微鏡写真で対比したのが図6および図7である。

この出願の発明の遠心培養法（図6）によって増殖した細胞の数は単層培養法（図7）によって増殖した細胞の数に比較して明らかに増加している状態が示されている。さらに、遠心培養により軟骨細胞に特有な球形状が維持されたが、単層培養では脱分化して繊維化が進んだ細胞に変化した。

以上の結果から、遠心培養により、細胞の増殖率が高くなると同時に細胞の脱分化が抑えられることが確認された。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって細胞を活性化し、脱分化を抑制して、再生医学における細胞増殖の足場材を効率的に作製できるだけでなく、テーラーメイド医療と称される患者の個人差を重視した特定細胞の増殖等を簡便、かつ、効率的に行なうことができる。

請求の範囲

1. 細胞を培養する環境下で継続的に、遠心力による静水圧の付加で力学環境を調節し、細胞に刺激を与えることを特徴とする細胞培養方法。
2. 静水圧の付加による力学的培養環境の調節では、遠心力によって細胞に対する静水圧の付加を周期的に変化させるか、もしくは一定期間持続することを特徴とする請求項1記載の細胞培養方法。
3. 静水圧の付加が60 MPa以下の範囲で行なわれることを特徴とする請求項1または2の細胞培養方法。
4. 静水圧の付加が0.5秒～6週間の範囲で行なわれることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかの細胞培養方法。
5. 静水圧の付加が遠心機の回転数の調節により行なわれることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかの細胞培養方法。
6. 温度と雰囲気物を調節することを特徴とする請求項1ないし5のいずれかの細胞培養方法。
7. 各種生体材料とともに細胞を培養することを特徴とする請求項1ないし6のいずれかの細胞培養方法。
8. 密閉容器内に回転軸で支持されて遠心回転によって細胞に静水圧が付加される細胞培養器を備えていることを特徴とする細胞培養装置。
9. 細胞培養器の回転時間と回転速度を制御する制御機構が備えられていることを特徴とする請求項8の細胞培養装置。
10. 60 MPa以下の静水圧を付加するために回転数が10～25000 rpmの範囲で制御可能とされていることを特徴とする請求項8または9の細胞培養装置。
11. 細胞培養器内部が同時に複数種類の細胞培養ができるように区分されていることを特徴とする請求項8ないし10のいずれかの細胞培養装置。
12. 密閉容器内への雰囲気ガスの注入口とその排気口、並びに雰囲気

気ガスの注入・排気の制御機構が備えられていることを特徴とする請求項 8 ないし 11 のいずれかの細胞培養装置。

13. 密閉容器内の温度の制御機構が備えられていることを特徴とする請求項 8 ないし 12 のいずれかの細胞培養装置。

図 1

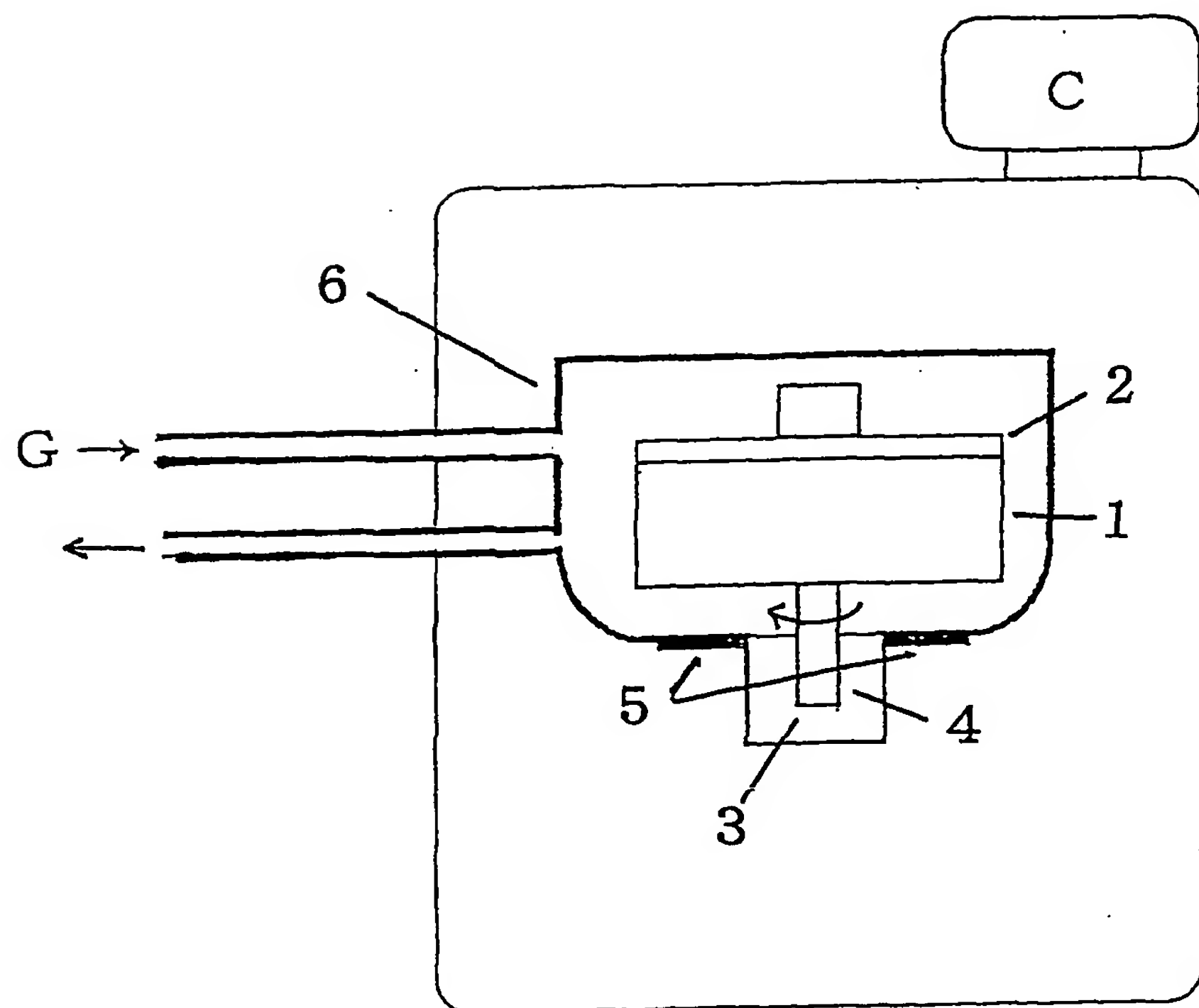


図 2

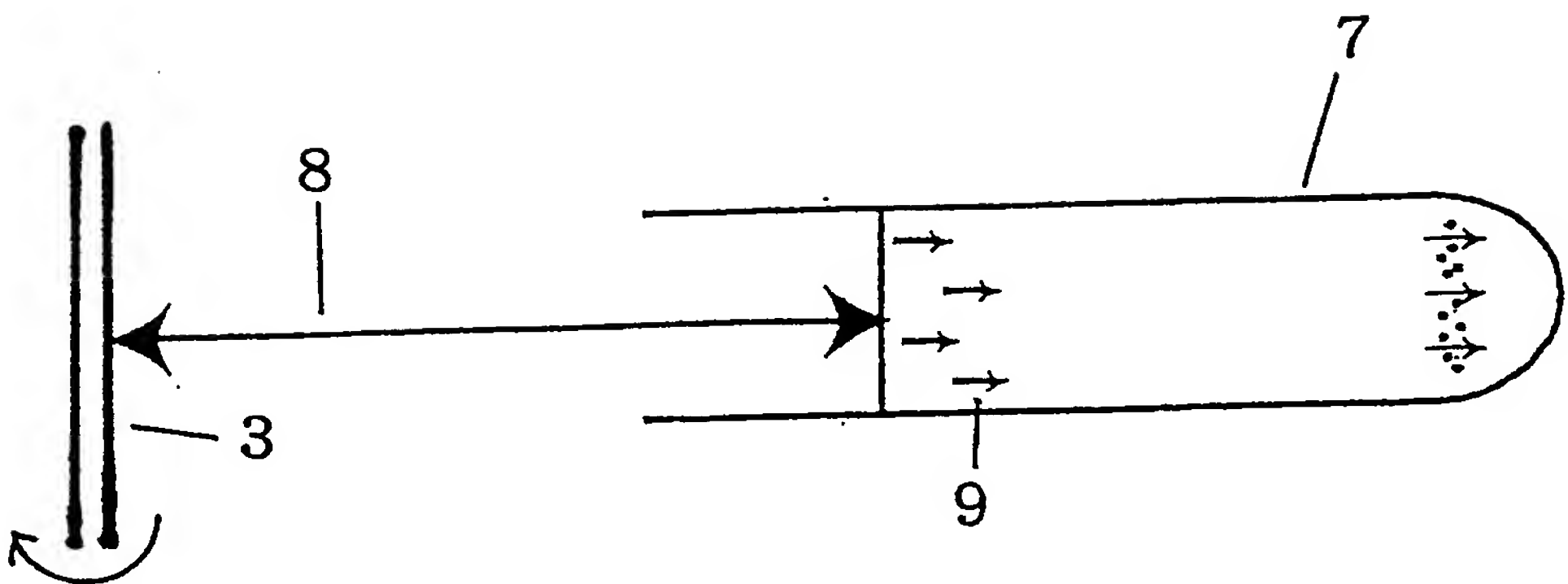


図 3

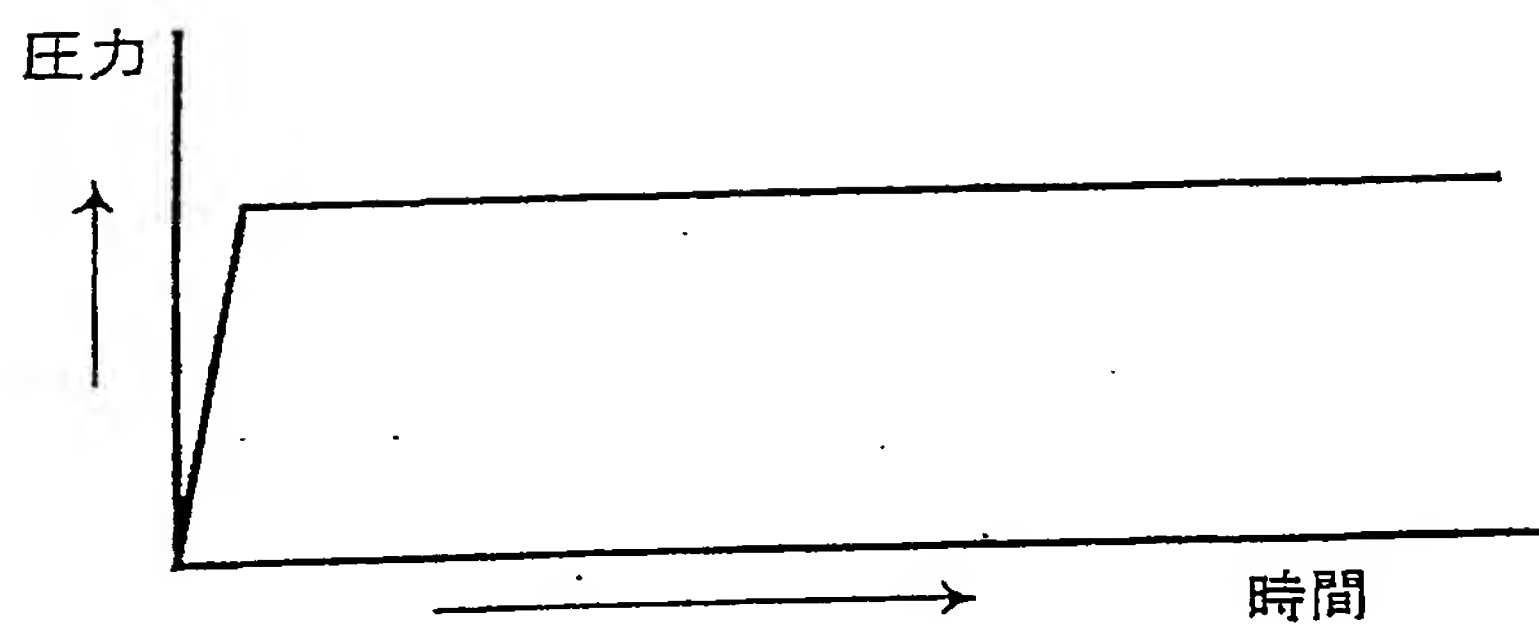


図 4

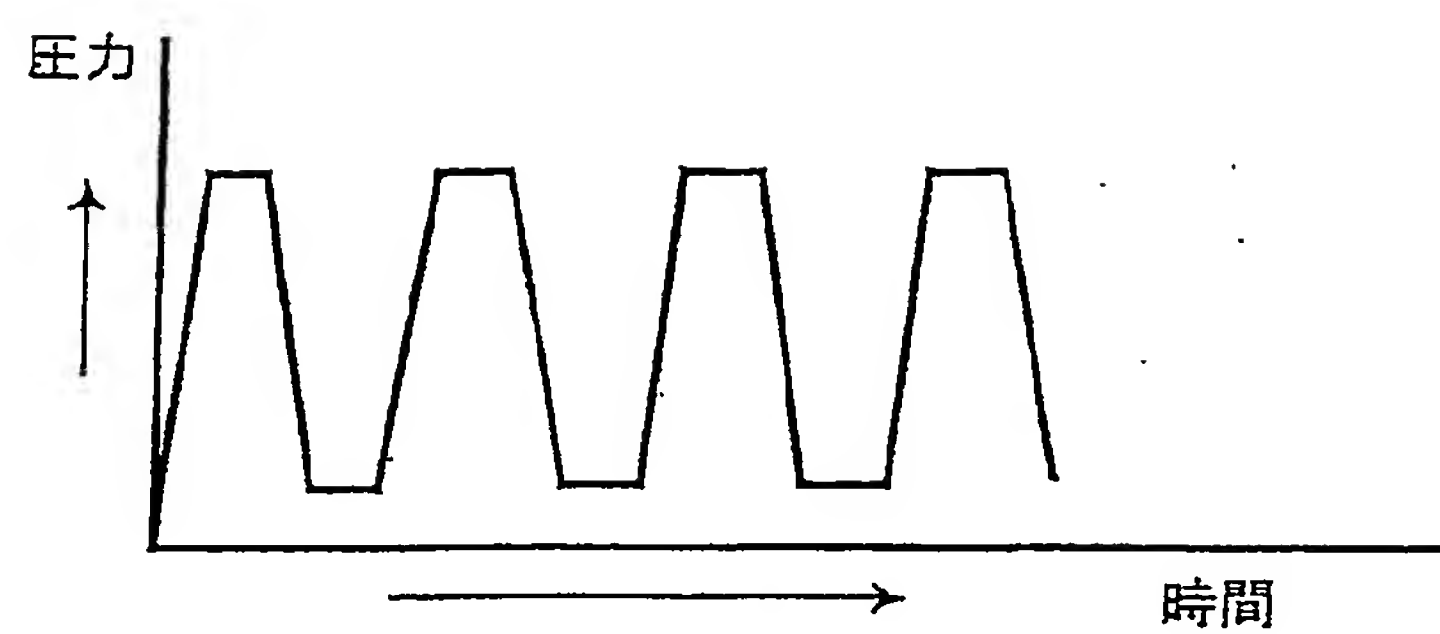


図 5

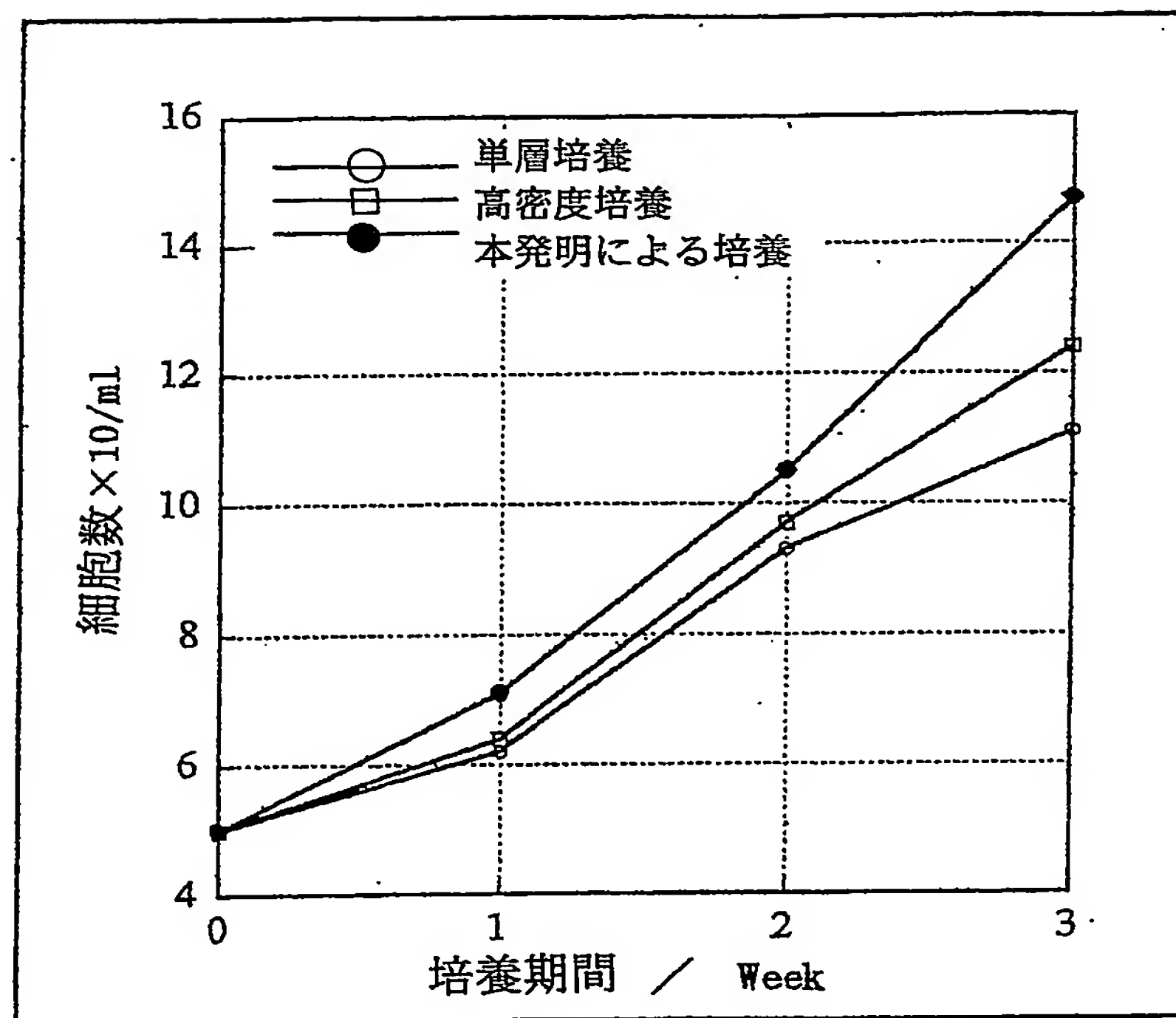


図 6

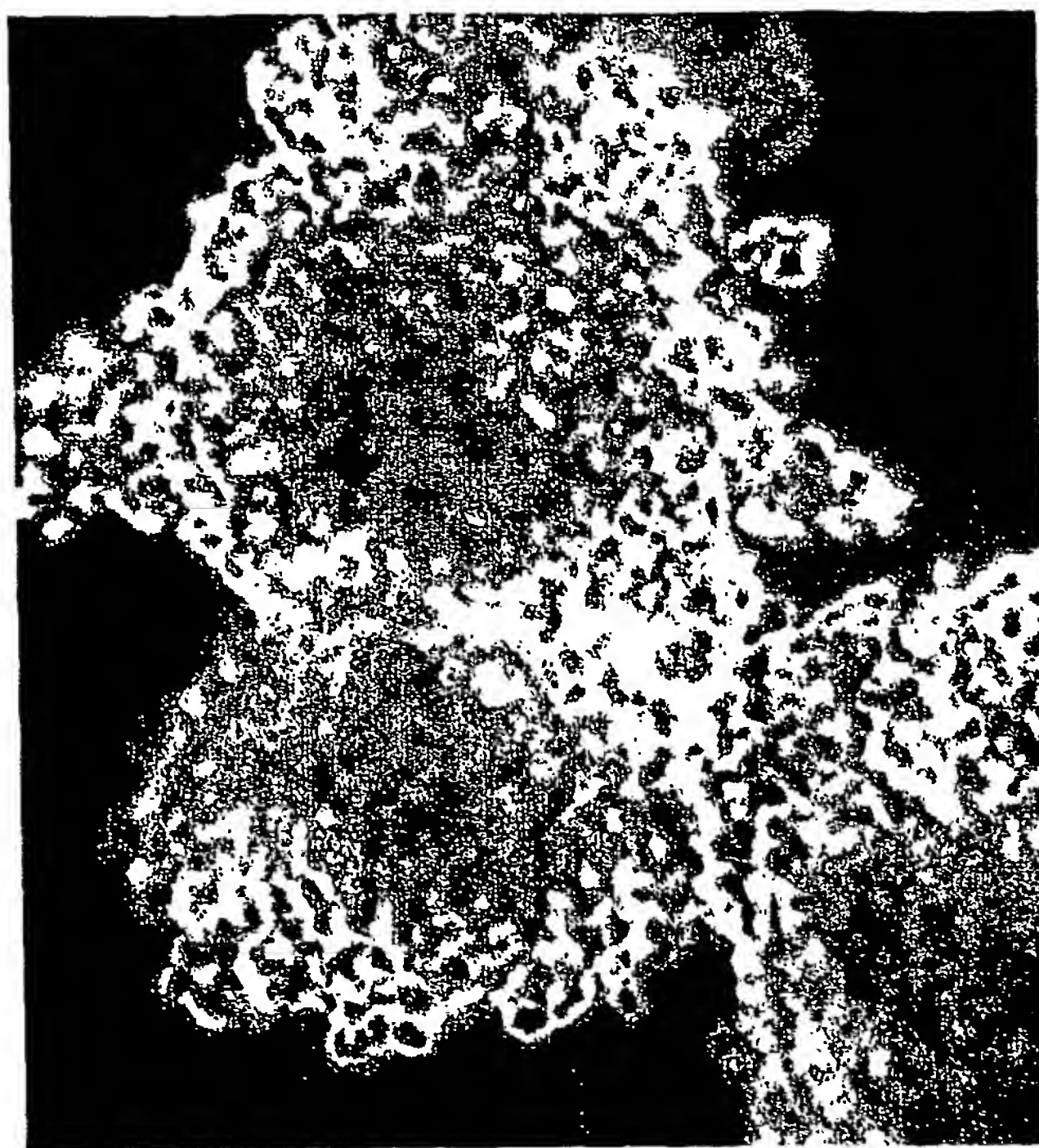


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N5/00, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N5/00, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/30101 A (KINETIC BIOSYSTEMS INC.), 03 October, 1996 (03.10.96), & US 5622819 A & EP 820337 A & US 5821116 A & JP 11-502715 A	1-13
X	WO 99/60093 A (ANDREWS A K), 25 November, 1999 (25.11.99), & EP 1082407 A2 & US 6214617 B & JP 2002-515239 A	1-13
Y	MAUCK R L. et al., Dymatic hydrostatic pressurization increases matrix gene expression by chondrocytes in 3D culture., Am Soc Mech Eng Bioeng Div. (2001), Vol.51, pages 295 to 296	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
12 September, 2003 (12.09.03)

Date of mailing of the international search report
30 September, 2003 (30.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIZUNO S. et al., Effects of physical stimulation on chondrogenesis in vitro., Mater Sci Eng C (1998), Vol.C6, No.4, pages 301 to 306	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/00, C12M1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/00, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/30101 A (KINETIC BIOSYSTEMS INC) 1996.10.03 & US 5622819 A & EP 820337 A & US 5821116 A & JP 11-502715 A	1-13
X	WO 99/60093 A (ANDREWS A K) 1999.11.25 & EP 1082407 A2 & US 6214617 B & JP 2002-515239 A	1-13
Y	MAUCK R L., et.al., Dymatic hydrostatic pressurization increases matrix gene expression by chondrocytes in 3D culture., Am Soc Mech Eng Bioeng Div. (2001), Vol.51, p.295-296	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.09.03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MIZUNO S., et. al., Effects of physical stimulation on chondrogenesis in vitro., Mater Sci Eng C(1998), Vol. C6, No. 4, p. 301-306	1 - 1 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.